

М.В. Эйдельштейн, А.К. Жерносек

## ИЗУЧЕНИЕ ГИДРОФОБНОСТИ НЕКОТОРЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ ХИНОЛОНОВОГО РЯДА МЕТОДОМ ВЭЖХ

Витебский государственный медицинский  
университет

*Исследовано влияние состава и свойств подвижной фазы на удерживание некоторых лекарственных веществ хинолонового ряда на колонках Spherisorb ODS II и Lichrospher RP18. Значения коэффициентов емкости хинолонов коррелируют с их коэффициентами распределения в системе вода – октанол.*

### ВВЕДЕНИЕ

Хинолоны - большая группа синтетических химиотерапевтических лекарственных средств широкого спектра действия. Данные лекарственные вещества, в особенности их фторсодержащие представители (фторхинолоны), имеют высокую степень биодоступности, большой объем распределения, хорошо абсорбируются из желудочно-кишечного тракта, быстро достигают пиковой концентрации в плазме крови, создают высокие концентрации в тканях и биологических жидкостях. Большинство фторхинолонов обладает хорошей переносимостью и низкой токсичностью для организма человека [1 - 3].

Изучение физико-химических характеристик хинолонов, основной из которых является степень гидрофобности, является актуальной задачей. Степень гидрофобности определяет такие свойства лекарственных веществ, как абсорбция и проникновение через клеточные оболочки, распределение в организме, связывание с белками плазмы и тканей, характерные пути метаболизма и элиминации, антимикробная активность.

Целью настоящей работы является изучение гидрофобных свойств некоторых антимикробных лекарственных веществ

хинолонового ряда методом обращённо-фазовой ВЭЖХ.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

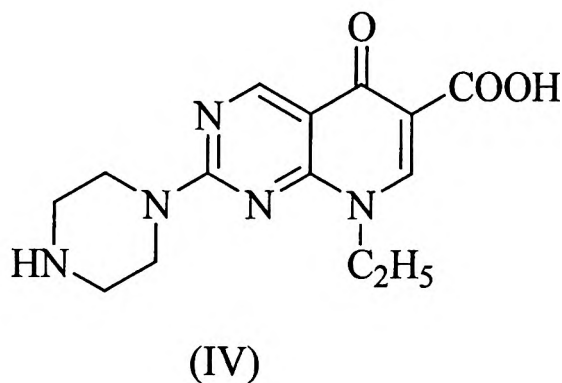
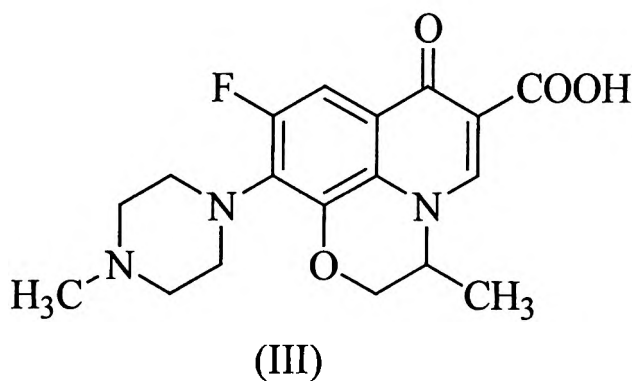
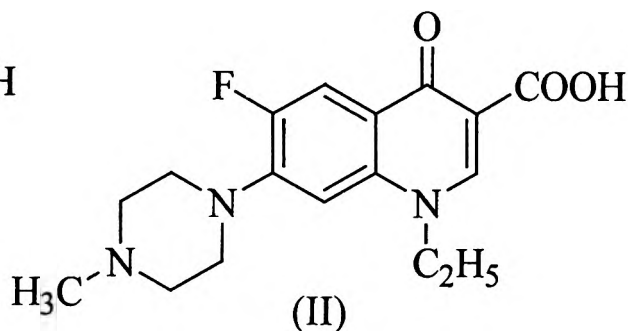
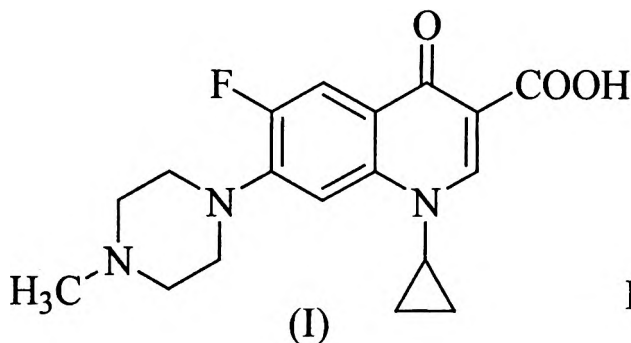
В работе использованы рабочие стандартные образцы ципрофлоксацина, офлоксацина, пефлоксацина и пипемидиевой кислоты.

В качестве органического компонента подвижной фазы применяли метанол и ацетонитрил (соответствовали категории реактивов для ВЭЖХ). Другие реагенты: тетрабутиламмония гидросульфат, натрия перхлорат, аммония перхлорат, магния хлорид, натрия дигидрофосфат, калия дигидрофосфат, аммония дигидрофосфат, хлороводородная, хлорная, ортофосфорная, серная, лимонная, уксусная, трихлоруксусная кислоты и натриевые соли этих кислот соответствовали категории ЧДА. Для приготовления всех элюентов использовалась вода, очищенная с помощью системы Milli-Q. Аналитические колонки: Spherisorb ODS II (250 x 4,6 мм), Lichrospher RP 18 (250 x 4,6 мм); насос для подачи растворителя: IsoChrom LC pump; прибор для автоматического внесения проб - Kontron HPLC Autosampler 360; термостат - Haake E II; детектор - Spectroflow 757 UV absorbance detector.

Концентрация всех веществ, вносимых в подвижную фазу, рассчитана относительно полного объема подвижной фазы. Детекция элюируемых веществ осуществлялась при длине волны 260 нм. Скорость потока составляла 1 мл/мин. Для термостатирования колонки была использована водяная баня. Все измерения проводились при 25 °С. Для проведения разделения исследуемые вещества растворяли в 2 мМ NaOH до конечной концентрации 18,75 мкг/мл для пипемидиевой кислоты и 37,5 мкг/мл для офлоксацина, ципрофлоксацина, пефлоксацина. Объем вводимой пробы - 80 мкл (объем петли - 100 мкл).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе работы были исследованы гидрофобные свойства ципрофлоксацина (I), пефлоксацина (II), офлоксацина (III), а также пипемидиевой кислоты (IV).



Для оценки гидрофобности использовался коэффициент емкости (коэффициент извлечения) вещества ( $k'$ ) на колонке с гидрофобным носителем. Было исследовано влияние состава и свойств подвижной фазы на характер и время удерживания хинолонов. Изучено влияние различных ионов, входящих в состав подвижной фазы, на гидрофобные свойства хинолонов и механизмы их взаимодействия с неподвижной фазой.

**Влияние pH на время удерживания фторхинолонов.** Различные ионные формы хинолонов обладают разной степенью гидрофобности, поэтому время удерживания и соответствующие значения  $k'$  исследуемых соединений зависят от pH подвижной фазы.

Определены коэффициенты извлечения пипемидиевой кислоты и ципро-

флоксацина при pH 3,00, 5,24 и 7,00 и объемной доле метанола от 20 до 40% (для каждого значения pH). Установлено, что для исследованных соединений значения  $\lg k'$  уменьшались с увеличением содержания органического компонента в подвиж-

ной фазе (рис. 1). Параллельное расположение кривых свидетельствует о структурном сходстве разделяемых соединений. Минимальный угол наклона характеристических кривых и наибольшие значения  $k'$  наблюдались при значениях pH подвижной фазы близких к pI соответствующих соединений (pH 7 для пипемидиевой кислоты, ципрофлоксацина).

Исследовано удерживание хинолонов на обращенной фазе в более широком диапазоне значений pH (объемная доля метанола в элюенте составляла 40%). На рис. 2 приведены значения  $k'$  для пипемидиевой кислоты, ципрофлоксацина, офлоксацина при pH 3,0 - 7,0.

Все хинолоны обладают максимальной гидрофобностью при pH близком к изоэлектрической точке [8, 9]. Кривые зависимости  $k'$  от pH сходны с кривыми,

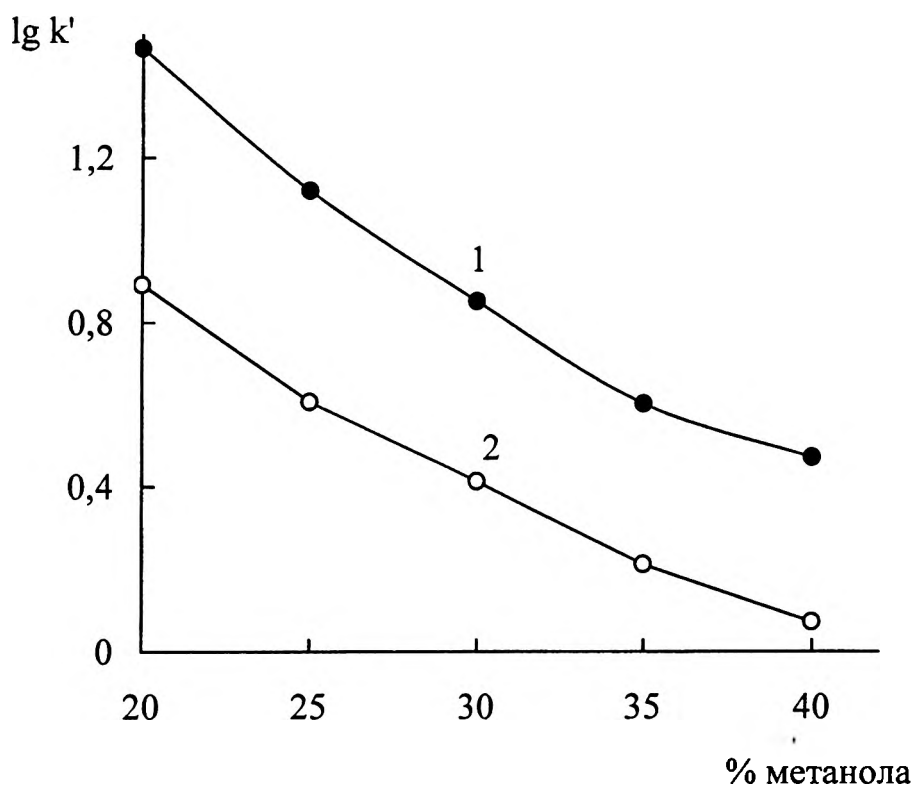


Рис. 1. Влияние объёмной доли метанола на величину  $\lg k'$  для ципрофлоксацина (1) и пипемидиевой кислоты (2) при pH 5,24

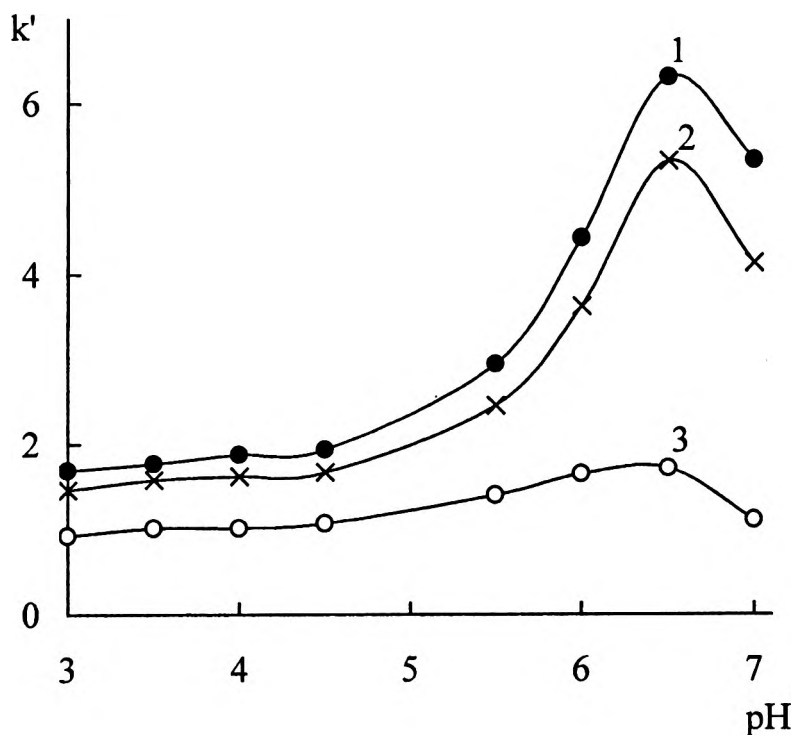


Рис. 2. Влияние pH на удерживание ципрофлоксацина (1), офлоксацина (2) и пипемидиевой кислоты (3) 40% метанола, 50 мМ натрий-фосфатный буферный раствор

отражающими влияние pH раствора на относительное содержание в нем незаряженных молекул хинолонов.

**Влияние концентрации соли в подвижной фазе на время удерживания хинолонов.** Исследовано удерживание пипемидиевой кислоты и ципрофлоксацина при различных концентрациях натрия дигидрофосфата (0,01, 0,05 и 0,1 М). Объемная доля метанола в подвижной фазе изменялась от 20 до 40% для каждой концентрации соли (pH подвижной фазы 5,24).

Увеличение концентрации натрия дигидрофосфата в области от 0,01 до 0,05 М привело к значительному снижению времени удерживания всех хинолонов. Увеличение концентрации буферного раствора до 0,1 М вызывает незначительное изменение величин  $k'$ .

При уменьшении концентрации натрия дигидрофосфата до 0,01 М удерживание ципрофлоксацина становилось нехарактерным для обращенно-фазовой хроматографии. Это, возможно, связано с тем, что вещества, имеющие в своей структуре основные группы, способны удерживаться на колонке не только за счет гидрофобных, но и других типов взаимодействий, в частности, ионных [4, 6]. Существование дополнительных механизмов удерживания обычно связано с присутствием на поверхности носителя свободных силанольных групп, которые в определенных условиях выполняют роль катионообменников. Описанный выше эффект ослабления удерживания хинолонов при увеличении ионной силы элюента может быть объяснен влиянием силанофильных взаимодействий. Катионообменный механизм играет наиболее значительную роль в удерживании молекул, содержащих вторичные аминогруппы (пипемидиевая кислота, офлоксацин, ципрофлоксацин), поскольку в протонированной форме эти молекулы проявляют высокое сродство к катионообменнику.

Предположение о существовании дополнительных механизмов удерживания хинолонов позволило определить причину образования длинных "хвостов" (асимметрии) хроматографических пиков, вызывающих размывание полос разделяемых

веществ и снижение эффективности анализа.

**Сравнение результатов разделения хинолонов на колонках с разным содержанием свободных силанольных групп.** Значения  $k'$ , полученные при разделении хинолонов на колонках типа Spherisorb ODS II с относительно низким содержанием несвязанных силанольных групп, были сопоставлены с соответствующими значениями, полученными на колонке типа Lichrospher RP18 с высоким содержанием свободных силанольных групп. На этой колонке проводилось разделение пипемидиевой кислоты, офлоксацина, ципрофлоксацина. Состав подвижной фазы при этом оставался таким же, как и для предыдущего типа колонок (0,01 М  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 40% метанола, pH 5,24). Установлено, что значения  $k'$  для всех соединений были приблизительно в 1,3 раза больше соответствующих значений, полученных на колонках Spherisorb. Эти данные свидетельствуют об участии свободных силанольных групп в удерживании молекул, несущих положительно-заряженные группы.

**Влияние различных катионов и анионов в подвижной фазе на время удерживания хинолонов.** Исследовано влияние различных органических и неорганических катионов на время удерживания хинолонов. Было установлено, что элюирующая способность исследованных катионов убывает в последовательности, соответствующей классическому элюотропному ряду:  $\text{Mg}^{2+} > (\text{C}_4\text{H}_9)_4\text{N}^{+} > (\text{NH}_4)^{+} > \text{K}^{+} > \text{Na}^{+} > \text{H}^{+}$ . Из полученных данных следует, что соли аммония или тетрабутиламмония более эффективны в снижении влияния силанольных групп, чем более широко используемые натриевые соли.

Известно, что образование "ионных пар" существенно влияет на удерживание ионогенных соединений [5]. При образовании "ионных пар" между основными группами хинолонов и различными анионами, включенными в состав подвижной фазы в качестве ион-парных реагентов, время удерживания этих соединений может значительно изменяться. Кроме того, образование "ионных пар" способно

уменьшить вероятность связывания со свободными силанольными группами. Данные эффекты были исследованы путем введения в состав подвижной фазы анионов, проявляющих различные катион-связывающие и гидрофобные свойства. Все анионы - трихлорацетат, хлорид, перхлорат, ацетат, дигидрофосфат, цитрат, сульфат добавлялись в подвижную фазу в виде натриевых солей в концентрации 0,05 М, подвижная фаза содержала 40% метанола (рН 5,24). Значения  $k'$  всех исследованных хинолонов снижались с увеличением ион-парной способности и гидрофобных свойств противоионов. Наиболее слабое удерживание наблюдалось при добавлении высокополярных анионов: цитрата и сульфата.

Полученные результаты позволяют подобрать оптимальные условия для определения фторхинолонов методом ВЭЖХ. Несмотря на наличие дополнительных механизмов удерживания, таких, как ионные взаимодействия и водородные связи, гидрофобные взаимодействия играют главную роль. Подтверждением этому могут служить результаты сравнения полученных значений  $k'$  с коэффициентами распределения в системе вода - октанол (Р), представленными в литературе [7]. Корреляция между соответствующими значениями  $k'$  и Р для исследуемых соединений свидетельствует о достоверности определения степени гидрофобности методом ВЭЖХ (табл.).

Таблица

Сравнение коэффициентов емкости ( $k'$ ) и распределения (Р) в системе вода - октанол на примере некоторых хинолонов

Вещество	( $k'$ )*	(Р)**
Пипемидиевая кислота	1,11	0,014
Офлоксацин	3,25	0,042
Ципрофлоксацин	5,34	0,058

\* - Подвижная фаза: 0,05 М  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 40% метанола, рН 7,0;

\*\* - Водная фаза: 0,1 М  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , рН 7,0

## ВЫВОДЫ

1. Значения коэффициентов емкости для всех исследованных хинолонов уменьшаются с увеличением содержания органического компонента в подвижной фазе.

2. Хинолоны, имеющие в своей структуре вторичную или третичную аминогруппы, способны удерживаться на колонках с обращенной фазой не только за счет гидрофобных, но и иных типов взаимодействий, в частности, ионных и водородных связей. Наличие дополнительных механизмов удерживания связано с присутствием на поверхности неподвижной фазы свободных силанольных групп.

3. Хинолоны способны к образованию "ионных пар" с анионами, содержащимися в подвижной фазе. Пипемидиевая кислота, офлоксацин и ципрофлоксацин легче образуют ионные пары, чем хинолоны, содержащие в своей структуре третичные аминогруппы (пепфлоксацин). Гидрофобные свойства хинолонов в виде ион-парных соединений могут значительно изменяться в зависимости от типа противоиона.

4. Полученные значения коэффициентов емкости лекарственных веществ хинолонового ряда коррелируют с их коэффициентами распределения в системе вода - октанол.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Дорофеев В.Л. Номенклатура и фармакопейный анализ лекарственных средств группы фторхинолонов // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. - 2001, № 4 - С. 5 - 14.

2. Навашин С.М., Навашин П.С. Фторхинолоны - современное значение в антибактериальной терапии, перспективы развития // Антибиотики и химиотерапия. - 1996. - Т. 41, № 9 - С. 4 - 10.

3. Падейская Е.Н. Фторхинолоны: значение, развитие исследований, новые препараты, дискуссионные вопросы // Антибиотики и химиотерапия. - 1998. - Т. 43, № 9. - С. 38 - 44.

4. Стыскин Е.Л., Ициксон Л.В., Брауде Е.В. Практическая ВЭЖХ. - М.: Химия, 1989 - С. 33-34.

5. Ahnuja S. Selectivity and detectability optimizations in HPLC. – A Wiley interscience publication (JOHN WILEY & SONS). – 1989 – P. 51, 163.

6. Chu D., Fernandes P.B., Claiborn A.K. Structure-activity relationships in quinolone antibacterials: replacement of the 3-carboxylic acid group / Quinolones. – Prous Science Publishers, S.A. – 1989. - P. 37 - 42.

7. Fasching C.E., Peterson L.R. High pressure liquid chromatography of (BAY o 9867) ciprofloxacin in serum samples // J. Liquid Chromatogr. – 1985. – Vol. 8, № 3. – P. 555 – 562.

8. Ross D.L., Riley C.M. Physico-chemical properties of the fluoroquinolones antimicrobials. 1-Octanol/water partition coefficients and their relationships to structure. // International Journal of Pharmaceutics. - 1992, - Vol.88. – P. 379 – 289.

9. Takacs-Novak K., Jozar M., Hermecz I. Lipophilicity of fluoroquinolones. // International Journal of Pharmaceutics. - 1992, - Vol.79. - P. 89 – 96.

#### *SUMMARY*

M.V. Eidelshtein, A.K. Zhernosek

#### INVESTIGATION OF HYDROPHOBICITY OF SOME QUINOLONE DRUGS BY HPLC

Influence of the composition and properties of mobile phase on the retention behavior of some quinolone drugs on Spherisorb ODS II and Lichrospher RP18 is investigated. Capacity factors of the quinolones are correlated with their water – octanol partition coefficients.

\*\*\*\*\*